

WO02066668

Publication Title:

Method for producing proteins by fermentation of microorganisms from the thermus family the protein mixture thus obtained and cosmetic compositions containing same

Abstract:

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 août 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/066668 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **C12P 21/00**

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00488

(22) Date de dépôt international : 7 février 2002 (07.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/02442 21 février 2001 (21.02.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SE-
DERMA [FR/FR]; 29 rue du Chemin Vert, BP 33, F-78612
Le Perray-en Yvelines Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LINTNER,
Karl [FR/FR]; 69 rue de l'Assomption, -, F-75016 Paris
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEINS BY FERMENTATION OF MICROORGANISMS FROM THE THERMUS
FAMILY, THE PROTEIN MIXTURE THUS OBTAINED AND COSMETIC COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : PROCEDE DE FABRICATION DE PROTEINES PAR FERMENTATION DE MICRO-ORGANISMES DE LA FA-
MILLE THERMUS, MELANGE DE PROTEINES AINSI OBTENU ET COMPOSITION COSMETIQUES LES CONTENANT.

(57) Abstract: The invention relates to the use of fermentation media for microorganisms from the Thermus family, in particular microorganisms collected in marine waters close to very deep hydrothermal sources, especially those obtained with the GY1211 strain. The invention also relates to certain cosmetic compositions containing one or more types of fermentation media for said microorganisms and which are used, in particular, for skin care, notably for the face, body and scalp, and hair care and in order to modulate the cutaneous concentration of ceramides, to stimulate the immune system, to provide protection by means of the chaperone effect and a detoxifying and anti-free radical effect, particularly in relation to the oxygen peroxide.

(57) Abrégé : L' invention se rapporte à l'utilisation des milieux de fermentation de micro-organismes de la famille Thermus, notamment des micro-organismes récoltés dans les eaux marines près des sources hydrothermales de grande profondeur, en particulier ceux obtenus avec la souche GY1211. Elle se rapporte aussi à certaines compositions cosmétiques contenant un ou plusieurs types de milieux de fermentation de ces micro-organismes, utilisées notamment pour le soin de la peau, en particulier du visage, du corps et du cuir chevelu ainsi que pour le soin du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

WO 02/066668 A2

Titre: Procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes de la famille *Thermus*, mélange de protéines ainsi obtenu et composition cosmétique les contenant.

La peau est la première image que chacun de nous offre au regard des autres et, de tout temps son aspect a été un sujet de préoccupation.

Au cours de la vie, tant professionnelle que privée, l'exposition au soleil ainsi que les diverses pollutions provoquent des agressions chimiques et physiques qui induisent la production, entre autres facteurs, de différentes formes radicalaires de l'oxygène. Ces dernières, notamment au niveau cutané, provoquent des dégâts irréversibles dont les conséquences sont *a minima* des érythèmes, *coups de soleil*, vieillissement prématuré de la peau, et, *a maxima*, des cancers de la peau.

L'aggravation des manifestations acnéiques, la perte de la souplesse cutanée, le dessèchement de la peau et l'apparition des rides correspondent aux premières manifestations macroscopiques du vieillissement. Au niveau des cellules cutanées, les modifications moléculaires mises en évidence dès les premières expositions au soleil, qui ne peuvent être décelées que par des méthodes invasives et très sophistiquées, sont donc encore plus pernicieuses puisque non détectables par la population en général.

Le soleil n'est pas le seul responsable de la production des radicaux libres de l'oxygène. Un grand nombre de réactions biochimiques vitales, (comme par exemple l'oxydation des acides aminés ou celle des acides gras, la synthèse de prostaglandines...), engendrent tout naturellement ces formes hyper-réactives de l'oxygène, extrêmement toxiques pour les tissus en général et pour la peau en particulier.

Les êtres humains sont *naturellement* protégés contre les effets délétères des formes radicalaires de l'oxygène par des régulations physiologiques, développées au cours de l'évolution: bronzage progressif à partir du printemps contre les conséquences sub-érythémateuses cutanées, présence d'enzymes antiradicalaires telles que des superoxyde-dismutases et des catalases, diminution de la réaction inflammatoire et/ou immunitaire, épaissement de l'épiderme....

Pour résoudre ces problèmes, l'Industrie Cosmétique a mis sur le marché toutes sortes de produits contenant soit des filtres solaires, des compositions renfermant des enzymes naturelles présentes dans la peau telles que la SOD (superoxyde-dismutase), des extraits végétaux et autres.

Une autre enzyme naturelle, la catalase, ne peut être utilisée dans les compositions cosmétiques et dermopharmaceutiques car elle figure (sous le N° 74) dans la *liste des substances qui ne peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques* de l'annexe II(1) de la Directive européenne 93/35 du 14 Juin 1993.

5 Il est alors dans la logique des industries cosmétiques et dermo-pharmaceutiques de mettre au point des produits qui aident la peau à mieux supporter, voire à corriger et/ou à réparer, les effets néfastes de cette pollution chimique.

L'invention faisant l'objet de ce présent brevet, réside dans la découverte qu'il est possible d'obtenir, par des techniques de biotechnologie, des principes actifs possédant de puissants
10 effets antiradicalaires à partir de micro-organismes convenablement utilisés.

Les micro-organismes concernés font partie de nouvelles souches de thermophiles découvertes au niveau de résurgences hydrothermales sous-marines.

Ces bactéries sont capables de survivre à des températures où normalement les protéines sont dénaturées ainsi que sous pressions telles que les cellules ne peuvent maintenir une
15 homéostasie entre leur milieu intérieur et le milieu extérieur.

Jusqu'à maintenant, les micro-organismes thermophiles sont utilisés en biotechnologie pour préparer des ADN utilisables dans les nouvelles techniques d'amplification dite "PCR" (Polymerase Chain Reaction) à partir de lysats de cellules.

En effet, la production de principes actifs à partir de tels micro-organismes présente deux
20 intérêts majeurs:

- Les études phylogénétiques comparant les séquences d'ARN ribosomiaux 16S ont montré que tous les procaryotes dériveraient sans doute d'un même ancêtre commun thermophile. Ces thermophiles sont donc probablement constitués de substances originelles et originales susceptibles de posséder des effets thérapeutiques voire cosmétiques innovants.
- 25 • Certains métabolites produits par ces bactéries thermophiles sont thermostables, c'est à dire que leurs propriétés sont conservées à haute température. La durée de vie et l'activité des molécules pourraient en faire des actifs stables à long terme dans le produit cosmétique fini.

Le procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes faisant l'objet
30 de ce présent brevet utilise une souche du genre *Thermus*, en particulier *Thermus thermophilus*, variante GY1211, et ont été isolées à partir d'une résurgence hydrothermale sous-marine (à 2000 m de profondeur) de la dorsale est-Pacifique dans le bassin de Guaymas (golfe de Californie). Ce sont des Bacille Gram (-), dont la taille est sensiblement égale à 0,5

$\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ et qui sont aérobies, hétérotrophes, non-sporulés, thermophiles, barotolérants et qui, en culture, donnent des colonies orangées, rondes, régulières, lisses, non bombées.

La souche est enregistrée sous le numéro d'ordre I-2715 auprès de la collection Nationale de Culture des Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur de Paris.

5 Nous avons découvert que ces souches de thermophiles sont capables de produire ou de fournir des molécules qui possèdent de nombreuses activités physiologiques utilisables dans le domaine Cosmétique et Dermopharmaceutique.

Il est particulièrement intéressant de les cultiver soit pour leur faire excréter ces molécules, soit pour utiliser la biomasse obtenue.

10 Les exemples suivants indiquent les résultats que nous avons obtenus pour optimiser les conditions de culture pour obtenir ces deux objectifs.

Optimisation de la production de biomasse

Pour une application industrielle il fallait obtenir un maximum de biomasse tout en ayant un milieu de culture le plus simple et économique possible. Il a fallu évaluer l'influence des différents paramètres physico-chimiques sur la culture bactérienne et déterminer ainsi les facteurs limitants qui sont listés ci-dessous:

• Composition en éléments nutritionnels dans le milieu GY/01: l'extrait de levure et le NH_4Cl . Pour éviter les problèmes classiques que sont la coloration et l'odeur, il faut limiter leur concentration au minimum nécessaire. En ce qui concerne l'extrait de levure, il a été constaté que la concentration de 0,25% est la concentration limitante et qu'à 1, % on n'obtient pas plus de biomasse qu'à 0,5%. La concentration d'extrait de levure choisie est donc 0,5%. La concentration optimale d'utilisation du NH_4Cl choisie est trouvée à 0.3%

• Composition en sels et oligo-éléments
Thermus étant une bactérie marine, la teneur en NaCl est capitale et, dans nos conditions, nous avons choisi d'utiliser 1,0 % de NaCl dans le milieu de culture, des concentrations supérieures réduisant la quantité de biomasse obtenue.

Par ailleurs, nous avons choisi de réaliser les fermentations entre 72 et 75 °C, sous agitation, avec un pH égal à 7,2 sans ajustement en cours de culture.

Dans ces conditions, le temps de doublement de la population est égal à 47 minutes avec un taux de croissance μ_m égal à 0.386 (h^{-1}).

Optimisation de la production de protéines

La majorité des protéines sont généralement endocellulaires.

Après filtration (0,2 μ m), une électrophorèse unidirectionnelle du milieu fermenté par GY1211 démontre la seule présence de quelques bandes protéiques, seulement si le milieu a été préalablement concentré 20 fois. Il fallait donc trouver un moyen technique de faire sortir les protéines de la cellule.

5 De nombreuses expérimentations nous ont permis de mettre au point plusieurs procédures d'extraction de protéines en quantité satisfaisante et tout à fait compatible avec une utilisation industrielle.

Une procédure donnant toute satisfaction est la suivante: après la culture, on ajoute du Crodasinic LS30 (CRODA) à la concentration finale de 0,1% pendant 30 minutes.

10 Le dosage des protéines dans le milieu de culture, par simple colorimétrie indique une concentration minimale de protéines de *Thermus* égale de 0,2% quand l'électrophorèse unidimensionnelle démontre la présence de nombreuses bandes et donc la grande variété de protéine extraites. Il est à noter que ce traitement n'altère pas la structure quaternaire des protéines car les activités enzymatiques mesurées ne sont pas altérées. Enfin, il est important

15 de signaler que des essais complémentaires ont démontré l'invariance, tant qualitative que quantitative, du profil électrophorétique des protéines obtenues après un traitement thermique de 20 minutes à 100 °C, qualité qui démontre la pertinence du protocole de fermentation utilisé puisque les protéines obtenues ont les mêmes caractéristiques que celles du micro-organisme d'origine *Thermus* et notamment celles de la souche GY1211.

20 Alternativement à ce traitement détersif par le Crodasinic LS30 on peut employer la technique classique par homogénéisation haute pression, manipulation pourtant plus longue. Ainsi, nous avons réussi à optimiser la production de biomasse et la qualité des protéines recherchée chez *Thermus* grâce à une fermentation dont tous les paramètres ont été optimisés et par l'utilisation du Crodasinic LS30 en fin de fermentation comme moyen simple et peu

25 coûteux de récupérer les protéines bactériennes dans le milieu.

Bien qu'un seul exemple d'obtention soit décrit dans cette demande de brevet, d'autres procédés de fermentation et d'extraction de protéines ont été mis au point et, ainsi, tout autre procédé de fermentation et d'extraction de protéines peut être utilisé dans le cadre de ce brevet.

30 Par exemple, pour augmenter encore le taux de protéines dans le produit, il est possible de concentrer le milieu fermenté par tout procédé physique ou chimique comme, par exemple, sans que cela ne soit limitatif, par une filtration 0,2 μ m pour concentrer les bactéries avant l'ajout de Crodasinic LS30 ou encore, par une filtration sur seuil de coupure de petit poids

moléculaire (ultrafiltration tangentielle sur seuil 20kD), ce qui permettrait de se débarrasser des sels (cause potentielle de précipitation), des petits peptides (parfois cause de coloration et d'odeurs indésirables) et d'une partie du Crodasimic LS30. L'homme de l'art saura adapter et modifier ces techniques pour en optimiser l'utilisation selon les besoins spécifiques de la production.

Le produit obtenu après fermentation et filtration peut subir différents types de traitement: clarification, concentration ou dilution, conservation, purification, fractionnement par précipitation, par chromatographie, lyophilisation ou atomisation.

Une des réalisations préférées de l'invention est constituée par le milieu fermenté de GY1211 après traitement détersif et concentration par Ultrafiltration.

Les produits obtenus après l'un ou l'autre ou plusieurs de ces traitements (solutions, poudres, cristaux, émulsions, ...) peuvent être utilisés dans toutes les formes galéniques habituelles en cosmétique et en dermopharmacie. Les deux compositions suivantes sont données à titre d'exemples non limitatifs.

Exemple N° 1 - Crème de jour

Volpo S20	2,4
Volpo S2	2,6
Prostéaryl 15	8,0
Cire d'abeille	0,5
Abil [®] ZP2434	3,0
Propylène glycol	3,0
Carbopol [®] 941	0,25
Triéthanolamine	0,25
Milieu fermenté	5,0
Eau & conservateurs QSP	100g

Exemple N°2 - Lait corporel

Crillet 3	2,5
Novol	0,9
Fluilan	2,5
Carbopol 940	0,3
Cire d'abeille	2,0
Triéthanolamine	0,1

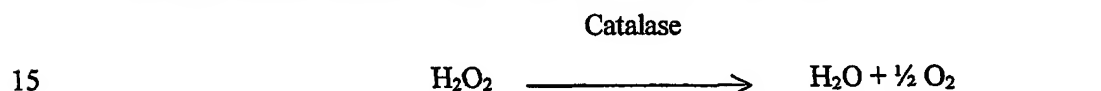
Glycérine	5,0
Milieu fermenté	3,0
Eau & conservateurs QSP	100g

5 Parmi les nombreux effets bénéfiques trouvés lors de la mise au point de ce produit, les plus importants méritants d'être mentionnés sont la régulation des concentrations de céramides cutanés, un effet immuno-stimulant du CD 40 observé *in vitro* sur les kératinocytes humains, une effet de protection de type protéine chaperonne, et un effet détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs par la présence de ménaquinone dans le milieu de culture faisant l'objet de ce brevet dont l'exemple suivant démontre l'effet vis à vis du seul

10 peroxyde d'oxygène mais qui n'est pas le seul radical libre concerné.

Exemple N°3 - Activité "catalase-like" *in vitro*

La méthode la plus simple pour mettre en évidence l'activité "catalase-like" consiste à suivre par spectrophotométrie la dégradation de l'H₂O₂ selon l'équation suivante:



15 L'H₂O₂ absorbe à 240 nm, donc la chute de DO à 240 nm est proportionnelle à la dégradation de H₂O₂ ce qui permet, par comparaison avec une gamme étalon réalisée à partir de catalase bovine, de mesurer l'activité enzymatique ou pseudoenzymatique de l'échantillon inconnu.

20 Le tableau suivant résume les activités pseudoenzymatiques de type catalase (moyennes \pm SEM) des milieux de cultures traités soit par le Crodasinic soit par haute pression (matériel APV), lors de 8 expérimentations indépendantes réalisées à 25° C où Facteur [C] indique la concentration du milieu réalisée.

Activité exprimée en U/ml			
Echantillon:	Facteur [C]	Crodasinic	APV
Milieu non Fermenté	x 1	0	0
Milieu Fermenté	x 1	0,37	0,45
Milieu fermenté ultrafiltré	x 10	4,91	5,02

25 On observe pour tous les échantillons fermentés par Thermus une activité enzymatique alors

30 que les milieux de cultures non fermentés, eux, en sont dépourvus. De plus, le rapport entre les activités mesurées est cohérent avec celui de la concentration réalisée.

Il est possible également de constater que les traitements utilisés sont équivalents en terme d'activité enzymatique obtenue.

Enfin, il est particulièrement important de signaler que si l'activité de la catalase bovine chute avec la température à laquelle le test est réalisé (- 25% d'activité à 45°C vs 25°C), l'activité pseudoenzymatique des milieux de fermentation de *Thermus* augmente considérablement avec la température puisqu'à 45°C elle est multipliée par un facteur de 4,5. Comme dans son environnement naturel, *Thermus* GY1211 vit à des températures de l'ordre de 70°C, il est logique que ses mécanismes de défense soient particulièrement efficaces à haute température.

D'un point de vue cosmétique, cette « activation » par la chaleur constitue un atout considérable. En effet, c'est principalement l'été que l'on s'expose au soleil et où on a le plus besoin d'une activité catalase-like. Or dans ces conditions la température de la peau peut atteindre des températures supérieures à 30°C.

L'activité n'a pas été mesurée au delà de 45°C car on atteint alors des conditions incompatibles avec la température de la peau *in vivo*.

Ainsi, le milieu fermenté décrit précédemment qui possède des activités enzymatiques peroxydasiques, catalase-like, antiradicalaires, inhibitrices de la glycation, et de modulation de la synthèse de collagène, peut-être utilisé pour les soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs dont, notamment, le peroxyde d'oxygène, par la présence de ménaquinone dans le milieu de culture faisant l'objet de ce brevet.

Dans les compositions utilisées selon l'invention, les milieux fermentés sont utilisés généralement entre 0,001% et 2% (p/p) en poids sec pour des milieux concentrés, lyophilisés ou atomisés, généralement entre 0,1 et 10,0% (p/p) pour les milieux fermentés sous forme liquide.

Le milieu fermenté peut être utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermatopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampoings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette liste soit limitative.

Il est possible d'incorporer le milieu fermenté dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, de les absorber sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

5 Le milieu fermenté peut être combiné dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, autres extraits marins.

10 Les compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques contenant le milieu fermenté peuvent être des crèmes, baumes ou des gels ou des lotions ou crèmes solaires et après solaires, des produits après-rasage, des crèmes épilatoires ou post-épilatoires.

Ces compositions cosmétiques contenant le milieu fermenté ou dermopharmaceutiques sont destinées aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou artificiels ainsi que pour les soins de la

15 peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

20 Ces compositions cosmétiques contenant le milieu fermenté ou dermopharmaceutiques sont utilisées pour la préparation de médicaments destinés aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et

25 du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

Le milieu fermenté peut également être utilisé seul, ou incorporé dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques, lié(es) ou incorporé(es) ou absorbé(es) ou

30 adsorbé(es) sous forme de macro-, micro- et nanoparticules ou dans des macro-, micro- et nanocapsules pour une application sur ou dans les textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériau susceptible d'être utilisé pour réaliser des vêtements et sous-vêtements de jour ou de nuit, directement au contact de la peau ou des cheveux pour en permettre une

délivrance topique continue.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes, puis extraction des protéines produites, caractérisé en ce que les micro-organismes sont de la famille Thermus.
- 5 2. Procédé de fabrication de protéines selon la revendication 1, caractérisé en ce que les micro-organismes sont issus d'eaux marines situées à proximité de sources hydrothermales de grande profondeur.
3. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les micro-organismes sont de la souche GY1211, enregistrée sous le
10 numéro d'ordre I-2715 auprès de la collection Nationale de Culture des Micro-organismes de (CNCM) de l'Institut Pasteur de Paris.
4. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation est effectuée grâce à un milieu nutritionnel présentant un pH d'environ 7,2 et renfermant de l'extrait de levure à une concentration comprise entre
15 0.25 % et 1 % environ, du chlorure d'ammonium, du chlorure de sodium à une concentration ne dépassant pas 1% et des oligo-éléments.
5. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation a lieu entre 72 et 75°C environ, sous agitation.
6. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes,
20 caractérisé en ce que la fermentation est suivie d'un traitement détersif permettant l'extraction des protéines.
7. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation est suivie d'une étape de filtration à 0,2 μm et/ou une étape d'ultrafiltration.
- 25 8. Mélange de protéines obtenues par le procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que les protéines sont thermostables jusqu'à 100°C.
9. Mélange de protéines selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il renferme de la ménaquinone.
10. Mélange de protéines selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il possède des activités
30 enzymatiques peroxydasiques, catalase-like, antiradicalaires, inhibitrices de la glycation, et de modulation de la synthèse de collagène.
11. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique caractérisée en ce qu'elle renferme un mélange de protéines selon l'une des revendications 8 à 10.

12. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon la revendication 11 caractérisée en ce que les milieux fermentés sont utilisés généralement entre 0,001% et 2% (p/p) en poids sec pour des milieux concentrés, lyophilisés ou atomisés, généralement entre 0,1 et 10,0% (p/p) pour les milieux fermentés sous forme liquide.
- 5 13. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle se présente sous toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsion H/E et E/H, lait, pommade, lotion capillaire, shampooing, savon, stick et crayon, spray, huile corporelle.
- 10 14. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisée en ce que le mélange est incorporé dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules ou absorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
- 15 15. Compositions cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que le mélange est utilisé avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, autres extraits marins.
- 20 16. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de crème, baume ou gel, de lotion ou crème solaire et après solaire, de produit après-rasage, de crème épilatoire ou post-épilatoire.
- 25 17. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon les revendications 10 à 16, destinée aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou artificiels ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu, pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs, notamment, du peroxyde d'oxygène.
- 30 18. Utilisation du mélange selon les revendications 8 à 10 ou d'une composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon les revendications 11 à 17, pour la préparation de médicaments destinés aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané,

physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu.

- 5 19. Utilisation du mélange selon les revendications 8 à 10 ou d'une composition cosmétique ou dermatopharmaceutique selon les revendications 11 à 17, lié(e) ou incorporé(e) ou absorbé(e) ou adsorbé(e) sous forme de macro-, micro- et nanoparticules ou dans des macro-, micro- et nanocapsules, dans les textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériau susceptible d'être utilisé pour réaliser des vêtements et sous-vêtements de jour ou de nuit, directement au contact de la peau ou des cheveux pour en permettre une délivrance topique continue.